

## ⑫ 公開特許公報(A)

平1-114747

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)5月8日

G 01 N 27/46  
27/30M-7363-2G  
J-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

③ 発明の名称 バイオセンサ

② 特 願 昭62-273684

② 出 願 昭62(1987)10月29日

⑦ 発 明 者	末 次	佐 知 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑦ 発 明 者	小 林	茂 雄	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑦ 発 明 者	森 垣	健 一	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑦ 発 明 者	小 松	き よ み	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑦ 発 明 者	南 海	史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑦ 発 明 者	河 栗	真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑧ 出 願 人	松下電器産業株式会社		大阪府門真市大字門真1006番地	
⑧ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男		外1名	

## 明 細 書

## 1、発明の名称

バイオセンサ

## 2、特許請求の範囲

(1) 測定極と対極とからなる電極系を設け、この電極系上に酸化還元酵素、電子受容体と緩衝性塩(溶液状態で緩衝作用を示す塩)とを乾燥状態で保持させた構成のバイオセンサにおいて前記酸化還元酵素と分離した場所に、緩衝性塩を担持させたことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 緩衝性塩の担持場所が、前記酵素担持場所より上部に存在する特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

## 3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の試料中の特定成分を迅速かつ容易に定量することのできるバイオセンサに関するものである。

従来の技術

近年、酵素反応と電極反応を結びつけて、試料

中の特定成分を測定するバイオセンサが利用されるようになってきた。

以下に従来のバイオセンサについて説明する。

第3図は従来のバイオセンサの断面図であり、12は絶縁性基板、13と14は絶縁性基板12上に導電性カーボンペーストをスクリーン印刷し、加熱乾燥して形成した測定極と対極である。15は絶縁層で、絶縁性樹脂ペーストを絶縁性基板12、測定極13、対極14上に前記同様、印刷、乾燥したものである。16は前記電極部上に設置された粘着性構造体で、17は粘着性構造体16上に固定された濾過層であり、膜厚10μmのポリカーボネート多孔体膜を使用している。18は保持枠、19と20は保持枠18内に固定された反応層と展開層で、反応層は担体としての多孔体に酸化還元酵素、電子受容体と緩衝性塩を共存担持し、展開層にはセルロース織布を用いている。

以上のように構成されたバイオセンサについて、以下その動作を説明する。試料液を上部から滴下すると、まず展開層20を試料液が速やかに拡が

り、次に反応層19への液の降下が起こる。反応層では緩衝性塩の作用により試料液のpHが一定に保たれ、試料液中の特定成分と、反応層中の酸化還元酵素と電子受容体との間で酸化還元反応が進行し、電子受容体が還元される。この時生成する電子受容体の還元量は試料液中の特定成分量に比例する。反応終了後の試料液は、測定を妨害するような巨大分子が透過層17で除去された後、電極上19, 14へ降下する。電極上では、電極反応により前記還元された電子受容体の酸化を行い、その酸化電流値から試料液中の特定成分量を測定する。

#### 発明が解決しようとする問題点

しかしながら前記の従来の構成では、反応層において酸化還元酵素と緩衝性塩が共存して担持されていて、担持過程での酵素と緩衝性塩溶液の濃縮乾燥の際、2種類の緩衝性塩間の溶解度の差により、一時的に溶液のpHが酸またはアルカリ側へ移動し、酵素たんぱく質を構成するアミノ酸残基に影響を及ぼし、酵素の立体構造が破壊され、

極端な場合、酵素が失活する。このため反応の安定化に必要な活性を得るには多量の酵素を担持しなければならないという問題点を有していた。

本発明は上記従来の問題点を解決するもので、酵素のpH変化による失活を阻止することにより、酵素の担持が少量でも必要な活性を得ることができ、十分反応可能なバイオセンサの反応層を提供することを目的とする。

#### 問題点を解決するための手段

この目的を達成するために本発明のバイオセンサは、測定極と対極とからなる電極系上に、緩衝性塩と酸化還元酵素とを分離配置したものであり、好ましくは酸化還元酵素より緩衝性塩が上部に存在する構成としたものである。

#### 作 用

この構成によって、酸化還元酵素の乾燥担持の際、酵素単独の水溶液が濃縮してゆくため、溶液のpHが中性に保たれ、酵素が安定に保持されて失活が防止され、少量の酵素担持量で高精度の測定が可能になるととなる。また実際の測定の際

には、まず上部に担持された緩衝性塩を溶解した試料緩衝液中で酵素反応を行うことができる。

#### 実施例

以下本発明の実施例の一例としてのグルコースセンサについて、図面を参照しながら説明する。

第1図は本発明の一実施例におけるグルコースセンサの断面図を模式的に示すものである。第1図において、1は絶縁性基板、2は測定極、3は対極、4は絶縁層、5は粘着性構造体、6は透過層、7は保持枠、11は展開層で、これらは従来例の構成と同じものである。8, 9, 10は本発明の反応層で、8は電子受容体担持層、9は酵素担持層、10は緩衝性塩担持層であり、各々、担体としてのセルロース多孔体を、電子受容体溶液としてのフェロシアン化カリウム水溶液、酵素水溶液としてのグルコースオキシダーゼ(GOD)水溶液、緩衝液としてリン酸-水素カリウムとリン酸水素二カリウムの水溶液(pH5.6)に含浸後、乾燥し作製したものである。

以上のように構成された本実施例のグルコース

センサについて、以下その動作を説明する。まず、試料液を第1図の上部に滴下すると、展開層11に拡がり、緩衝性塩担持層10において、緩衝性塩の緩衝性によりグルコースオキシダーゼの最も安定的に活性を得ることのできるpH5.6に調整された後、酵素担持層9で試料液中のグルコースと、グルコースオキシダーゼが特異的に反応し、さらに電子受容体担持層8において前記酵素担持層9での反応生成物とフェロシアン化カリウムの反応により、フェロシアン化カリウムが生成する。そして従来例と同様、透過層6を通過し、電極系2, 3上に降下した試料液中のフェロシアン化カリウムの酸化電流値を測定することにより試料中のグリコース濃度を検知できる。

第2図は前記のバイオセンサで測定した酸化電流値とグリコース濃度との関係を示すものである。Aは本発明の、反応層を緩衝性塩担持層、酵素担持層、電子受容体担持層に3分割分離して形成したもので、B, Cは従来例の緩衝性塩、酵素、電子受容体を一つの反応層内に共存して担持したも

のである。

なお、測定は各グルコース濃度で各々10回行い、その平均値とばらつきの幅を图中に示す。また、1回の測定に使用するグルコースオキシダーゼの平均担持活性量は、Aは10ユニット、Bは100ユニット、Cは10ユニットであり、その他の測定条件はA、B、Cとも等しい。この図より、Aでは電流値とグルコース濃度は360 mg/dlまで非常に良い直線性を示し、各グルコース濃度においても安定した測定値が得られる。これに対し、従来例のB、Cにおいては、Bのようにグルコースオキシダーゼを多量に担持すれば、グルコース濃度360 mg/dlまでの直線性と測定値の安定性が得られる。しかし、Cのようにグルコースオキシダーゼの担持量が少量になると、100 mg/dl以上の高濃度域での直線性が得られず、また各グルコース濃度における測定値のばらつきも大きい。

以上のように本実施例によれば、緩衝性塩と酵素とを分離して乾燥担持することにより、少量の

グルコースオキシダーゼ量でもグルコース量を精度良く測定することができる。これはグルコースオキシダーゼの乾燥担持の際、溶液の中性が保たれ、グルコースオキシダーゼがpH変化より失活することを防止できるためと考えられる。

なお本実施例では緩衝性塩と酸化還元酵素と電子受容体を各々分離した構造としたが、緩衝性塩と電子受容体、酸化還元酵素と電子受容体とは共存して担持しても本実施例と同様の効果が得られた。

また本実施例では緩衝液として、

$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$  緩衝液を用いたが、緩衝液は酢酸-NaOH緩衝液でも良い。

さらに本実施例では、電極系を測定極と対極の2極系としたが、電極系は参照極を加えて3極系でも良い。その場合には、電位が安定し、より精度良く測定できる。

電子受容体としては、上記に用いたフェリシアン化カリウム以外にも、P-ベンゾキノン、メチレンブルーなども使用できる。

#### 発明の効果

以上のように本発明によれば、測定極と対極とからなる電極系を設け、この電極上に酸化還元酵素と電子受容体と緩衝性塩とを乾燥状態で保持する構成のバイオセンサにおいて、酸化還元酵素と分離した場所に緩衝性塩を担持させることにより、グルコースオキシダーゼが少量でも十分な活性が保持され、十分精度良く測定できるという効果が得られる。

#### 4、図面の簡単な説明

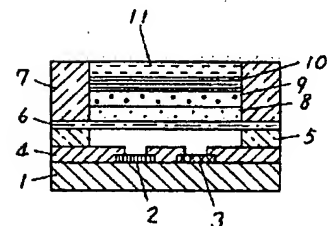
第1図は本発明の一実施例におけるバイオセンサの断面図、第2図はバイオセンサの応答特性図、第3図は従来例におけるバイオセンサの断面図である。

1……絶縁性基板、2……測定極、3……対極、4……絶縁層、5……導通層、6……電子受容体担持層、7……酵素担持層、8……緩衝性塩担持層。

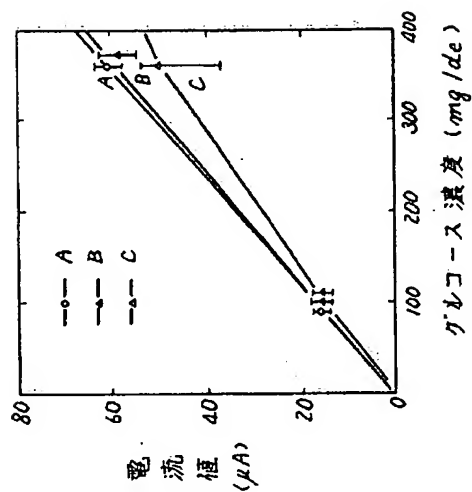
代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

- 1---絶縁性基板
- 2---測定極
- 3---対極
- 4---絶縁層
- 5---粘着性構造体
- 6---導通層
- 7---保持層
- 8---電子受容体担持層
- 9---酵素担持層
- 10---緩衝性塩担持層
- 11---展開層

第1図



第 2 図



第 3 図

